

細菌の薬剤耐性に関する研究

第 11 報

P^{32} 持続照射によるトリ型結核菌の SM および

INAH 感受性の変動について

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任: 柿下正道教授)

寺 崎 隆

政 岡 滋 実

(受付: 昭和33年11月10日)

緒 言

放射線は臨床的に諸種疾患の治療あるいは診断に貢献するところはなほ大であるが反面生体に対するその障害は今日きわめて重要な問題となつている。しかして放射線障害としては被放射体自体に直接認められるもの以外に遺伝子を通して子孫に現われるものが注目されるに至つている。一方 SM および INAH のごときすぐれた抗結核剤もそれぞれに対する菌の耐性化

という欠点を有しその使用面で思わざる制限を受けるのでこれが対策として幾多の手段が講ぜられておるが私らは耐性出現機序解明の一端に資せんとし遺伝的に重要な役割を演ずると考えられる放射線が結核菌の薬剤に対する変異に対しいかなる影響を及ぼすかを P^{32} 含有培地を用いて検討した。以下はその成績の概要である。

実験 I トリ型結核菌の SM および INAH 感受性に及ぼす P^{32} の影響

実験方法

1) 実験材料

- i) 使用菌株: トリ型結核菌竹尾株の感性株, それより分離した SM 耐性株および INAH 耐性株
- ii) 使用培地: Sauton 培地
- iii) 耐性測定用培地: 小川培地
- iv) P^{32} : 日本放射性同位元素協会より分与された orthophosphate ($Na_2HP^{32}O_4$)

2) 実験方法

P^{32} 放射能の減衰を考慮し, 菌移植時に 1ml 当たり 100 μc , 30 μc , および 1 μc になるように P^{32} 含有 Sauton 培地を作製, 大試験管にそれぞれ 10ml あて分

注する。Sauton 培地培養 5 日目の発育よい 3 菌株をそれぞれ手振り法にて約 5mg/ml の菌液とし, その 1ml あてを前記 P^{32} 含有培地に加える。以後 5 日目ごとに同様な方法で同一培地に 5 代継代, 毎代感性株では SM および INAH 感受性の変化を, SM 耐性株では SM に対する耐性度の変動を, INAH 耐性株では INAH に対する耐性度の変動を薬剤含有小川培地で測定した。なお P^{32} の菌の発育に及ぼす影響を観察するために初代培養のもののみについて各菌株別および P^{32} の濃度別に菌体の乾燥重量を測定した。

実験成績

表 1 に示すごとく培養後 5 日では各菌株とも

P^{32} の有無およびその濃度と無関係に乾燥重量

は大略 200mg で発育に及ぼす P^{32} の影響は認め難い。

表 2 は SM 耐性菌を P^{32} 100 μ c/ml, 30 μ c/ml, および 1 μ c/ml 含有 Sauton 培地にそれぞれ 5 代継代し各代ごとに小川培地で SM 耐性を測定したものである。同様に表 3 は INAH 耐性菌

の INAH 耐性度の変動を、表 4 は感性菌の SM および INAH 感受性の変動を測定したものである。

表 2, 3, 4 を通じてわかるごとく SM 耐性菌, INAH 耐性菌および感性菌の耐性分布には全然変化なく P^{32} の影響は認め難い。

実験 II トリ型結核菌感性株の SM および INAH 耐性化に及ぼす P^{32} の影響

実験方法

1) 実験材料

- i) 使用菌株：トリ型結核菌竹尾株（感性株）
- ii) 使用培地：Sauton 培地
- iii) 耐性測定用培地：小川培地
- iv) P^{32} ：日本放射線同位元素協会より分与された orthophosphate ($Na_2H^{32}PO_4$)

2) 実験方法

[A] SM 耐性化に及ぼす P^{32} の影響

次の 4 種の培地を作製した。

- a) Sauton 培地（対照）
- b) P^{32} 30 μ c/ml 含有 Sauton 培地
- c) SM 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地
- d) SM 0.05 γ /ml + P^{32} 30 μ c/ml 含有 Sauton 培地

以上の培地を実験 I と同様大試験管にそれぞれ 10 ml あて分注する。手振り法にて作製した Sauton 培地培養 5 日目の発育のよい感性菌約 5mg/ml の菌液の 1ml ずつを前記 4 種の培地に植え以後 5 日目ごとに同様な方法で同一培地に 5 代継代、毎代 SM 感受性の変動を測定した。

[B] INAH 耐性化に及ぼす P^{32} の影響

- a) Sauton 培地（対照）
- b) P^{32} 30 μ c/ml 含有 Sauton 培地
- c) INAH 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地
- d) P^{32} 30 μ c/ml + INAH 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地

の 4 種の培地を作製、前記の [A] におけると同様な方法で INAH 耐性の変動を測定した。

実験成績

[A] SM 耐性化に及ぼす P^{32} の影響

表 5 は SM, P^{32} および SM+ P^{32} をそれぞれ添加した培地での菌の発育状況を菌体の乾燥重量をもつて観察したものである。この表よりわかるごとく培養 5 日目ではその乾燥重量は約 180mg で SM, P^{32} および SM+ P^{32} の影響は認められない。

表 6 は実験方法でのべたごとく P^{32} (30 μ c/ml) 単独添加培地, SM (0.05 γ /ml) 単独添加培地, および P^{32} (30 μ c/ml) + SM (0.05 γ /ml) の併用添加培地にそれぞれ 5 日ごとに 5 代継代生菌数 $10^4 \sim 10^5$ 個を毎代 SM 含有小川培地に滴下耐性測定を行つた成績である。

この表よりわかるごとく P^{32} 単独添加の場合には 5 代継代しても SM 1 γ /ml 耐性菌も出現せ

ず、ほとんど対照と差違を示さない。また SM 単独添加の場合には最高 10 γ /ml 耐性菌がかりうじて認められるに至つたのに対し P^{32} +SM の併用の場合には 50 γ /ml 耐性菌の出現をみた。すなわち SM+ P^{32} は単独より菌を SM 耐性化する活性が大きいと思われる。

[B] INAH 耐性化に及ぼす P^{32} の影響

表 7 は INAH, P^{32} および INAH+ P^{32} をそれぞれ添加した培地での菌の発育状況を乾燥重量をもつて観察したものである。この表に示されるごとく前記の SM の場合と同様にこれら添加物の発育に及ぼす影響はみられない。

表 8 は P^{32} (30 μ c/ml) 単独添加培地, INAH (0.05 γ /ml) 単独添加培地および P^{32} (30 μ c/ml) + INAH (0.05 γ /ml) の併用添加培地に前記

SM の場合と同様それぞれ 5 日ごとに 5 代継代生菌数 $10^4 \sim 10^5$ 個を毎代 INAH 含有小川培地に滴下耐性測定を行つた成績である。この表より明らかごとく P^{32} 単独添加の場合は無添加対照培地における場合と同様で変化を認め難い。すなわちいずれも $17/\text{ml}$ および $57/\text{ml}$ 含

有培地での発育集落数もほぼ同一であつた。 $P^{32} + \text{INAH}$ 添加と INAH のみの添加の場合を比較すると継代ごとの耐性上昇はほとんど優劣をつけ難い。すなわち第 5 代で両者とも $107/\text{ml}$ 完全耐性となり $507/\text{ml}$ 耐性菌の出現程度も同じであつた。

考 按

東村¹⁾は P^{32} を $1.0 \sim 0.5 \mu\text{c}/\text{ml}$ の割に添加した培地でトリ型結核菌(獣調株)を培養したがその増殖速度になんら影響を認めなかつたと報告し、山村²⁾はヒト型結核菌 $H_{37}R_v$ 株では $30 \mu\text{c}/\text{ml}$ までの濃度の P^{32} の持続照射で、その発育速度は変らないが $40 \mu\text{c}/\text{ml}$ では著明に発育の阻害が認められたと報告している。

トリ型結核菌竹尾株を使用し P^{32} を $1 \sim 100 \mu\text{c}/\text{ml}$ の範囲に培地に添加して行つた本実験では感性菌、SM 耐性菌および INAH 耐性菌の 3 株とも、それぞれその発育速度は少しも影響されないという結果となつた。もちろん初代培養 5 日目の乾燥重量のみをもつて比較検討したのであるが漸次 5 代までの経過観察でも有意の差があるとは認め難かつた。

次に東村¹⁾は感性菌に対して P^{32} $1.0 \sim 0.5 \mu\text{c}/\text{ml}$ の持続照射で SM 耐性菌の出現率は $2 \sim 20$ 倍に増加し、また P^{32} と SM を併用すると SM

耐性菌の出現率は P^{32} および SM 各単独使用時の相加的なもので SM は P^{32} の mutagenic effect に影響を与えないとしている。しかして本実験で P^{32} の単独の場合には $1 \sim 100 \mu\text{c}/\text{ml}$ の範囲では SM 耐性菌および INAH 耐性菌のそれぞれ SM および INAH に対する耐性分布になんら変化を与えず、また感性菌の INAH および SM に対する感受性にも無影響であつたが SM + P^{32} の併用時には SM 単独添加の場合より SM 耐性菌の出現率が高かつたので P^{32} が SM による SM 耐性化に若干の影響を与えているように考えられる。

しかるに一方 INAH と P^{32} の併用による INAH 耐性菌の出現は INAH 単独の場合と有意の差を認め難く、このことは少なくとも菌の SM 耐性化と INAH 耐性化機序の差の一端を暗示しているものと推定されきわめて興味ある事実である。

結 論

トリ型結核菌竹尾株の感性菌、それより分離した SM 耐性菌および INAH 耐性菌を使用し、 P^{32} 持続照射の薬剤感受性および発育に及ぼす影響を観察し次の結論を得た。

- 1) 感性菌、SM 耐性菌および INAH 耐性菌の 3 株とも P^{32} $1 \sim 100 \mu\text{c}/\text{ml}$ の持続照射によつてそれぞれの発育速度に影響を受けず、SM および INAH 感受性にも変動を来さな

かつた。

- 2) 感性菌において P^{32} と SM を併用添加した場合の SM 耐性上昇は SM 単独時より若干強い。
- 3) 感性菌において P^{32} と INAH を併用添加した場合の INAH 耐性上昇は INAH 単独時のそれと同程度で P^{32} の影響はみられなかつた。

文 献

- 1) 東村道雄, 他: 日本細菌学雑誌, 32(11), 853, 1957.
- 2) 山村好弘, 他: 結核, 31(1), 41,

1956.

表1 感性菌, SM 耐性菌および INAH 耐性菌の
培養 5 日後の菌体乾燥重量(mg)

P ³² 濃度 * (μc/ml)	菌 株	SM 耐性菌	INAH 耐性菌	感 性 菌
100		205	207	193
30		195	203	190
1		192	194	204
0 (cont.)		200	190	201

** Sauton 培地に加えた P³² の濃度

表2 SM 耐性菌の耐性度に及ぼす P³² の影響
(Sauton 培地に P³² を添加し継代した場合)

P ³² 含有量 *				SM(γ/ml)	10,000	1,000	100	0 (cont.)
0	1	30	100	継代数				
μc/ml	μc/ml	μc/ml	μc/ml					
				1	##	##	##	##
				2	##	##	##	##
				3	##	##	##	##
				4	##	##	##	##
				5	##	##	##	##

註 (1) 培地 : 小川培地 判定 : 5 日

(2) ## : 250~300個のコロニー数

(3) * : Sauton 培地に 100μc/ml, 30μc/ml, 1μc/ml, 0μc/ml の P³² を添加

表3 INAH 耐性菌の耐性度に及ぼす P³² の影響

P ³² 含有量 *				INAH(γ/ml)	500	100	10	1	0 (cont.)
0	1	30	100	継代数					
μc/ml	μc/ml	μc/ml	μc/ml						
				1	—	##	##	##	##
				2	—	##	##	##	##
				3	—	##	##	##	##
				4	—	##	##	##	##
				5	—	##	##	##	##

註 (1) 培地 : 小川培地 判定 : 5 日

(2) ## : 250~300個のコロニー数

(3) * : Sauton 培地に 100μc/ml, 30μc/ml, 1μc/ml, 0μc/ml の P³² を添加

表4 感性菌(竹尾株)の薬剤感受性に及ぼす P^{32} の影響A. Sauton 培地に P^{32} 100 μ c/ml を添加し継代した場合

1) SM に対して

継代数 \ SM(γ /ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
1	—	—	—	##	##	##
2	—	—	—	##	##	##
3	—	—	—	##	##	##
4	—	—	—	##	##	##
5	—	—	—	##	##	##

2) INAH に対して

継代数 \ INAH(γ /ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
1	—	3	++	##	##	##
2	—	4	++	##	##	##
3	—	—	++	##	##	##
4	—	8	++	##	##	##
5	—	—	++	##	##	##

培地：小川培地 判定：5日 ++, ##：算定不能

註：各試験管に生菌数 $10^4 \sim 10^5$ 個接種B. Sauton 培地に P^{32} 30 μ c/ml を添加し継代した場合

1) SM に対して

継代数 \ SM(γ /ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
1	—	—	—	##	##	##
2	—	—	—	##	##	##
3	—	—	—	##	##	##
4	—	—	—	##	##	##
5	—	—	—	##	++	##

2) INAH に対して

継代数 \ INAH(γ/ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
1	—	6	++	+++	+++	+++
2	—	5	++	+++	+++	+++
3	—	4	++	+++	+++	+++
4	—	—	++	+++	+++	+++
5	—	8	++	+++	+++	+++

培地：小川培地 判定：5日 ++, +++：コロニー数算定不能
 註：各試験管に生菌数 $10^4 \sim 10^5$ 接種

C. Sauton 培地に P^{32} $1\mu c/ml$ を添加し継代した場合

1) SM に対して

継代数 \ SM(γ/ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
1	—	—	—	+++	+++	+++
2	—	—	—	+++	+++	+++
3	—	—	—	+++	+++	+++
4	—	—	—	+++	+++	+++
5	—	—	—	+++	+++	+++

2) INAH に対して

継代数 \ INAH(γ/ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
1	—	6	++	+++	+++	+++
2	—	5	++	+++	+++	+++
3	—	7	++	+++	+++	+++
4	—	—	++	+++	+++	+++
5	—	8	++	+++	+++	+++

培地：小川培地 判定：5日 ++, +++：コロニー数算定不能
 註：各試験管に生菌数 $10^4 \sim 10^5$ 接種

表5 P^{32} , SM および $P^{32}+SM$ の感性菌の発育に及ぼす影響

培地	(P^{32})	($P^{32}+SM$)	(SM)	(cont.)
乾燥重量	186 *	192	179	180

* 単位 mg 培養：5日

(P^{32}) : P^{32} $30\mu c/ml$ 含有 Sauton 培地

($P^{32}+SM$) : P^{32} $30\mu c/ml+SM$ $0.05\gamma/ml$ 含有 Sauton 培地

(SM) : SM $0.05\gamma/ml$ 含有 Sauton 培地

(cont.) : Sauton 培地

表6 P³², SM および P³²+SM の感性菌の
SM 感受性に及ぼす影響

培地	SM(γ /ml)	100	50	10	5	1	0.1	0 (cont.)
	継代数							
(P ³²)	1			—	—	—	##	##
	2			—	—	—	##	##
	3			—	—	—	##	##
	4			—	—	—	##	##
	5			—	—	—	##	##
(P ³² +SM)	1			—	—	12	##	##
	2			—	12	48	##	##
	3	—	—	6	65	138	##	##
	4	—	—	43	††	††	##	##
	5	—	2	††	##	##	##	##
(SM)	1			—	—	2	##	##
	2			—	—	21	##	##
	3			—	11	102	##	##
	4	—	—	—	36	††	##	##
	5	—	—	1	163	††	##	##
(cont.)	1			—	—	—	##	##
	2			—	—	—	##	##
	3			—	—	—	##	##
	4			—	—	—	##	##
	5			—	—	—	##	##

培地：小川培地 判定：5日 ††, ##：コロニー数算定不能

(P³²)：P³²30 μ c/ml 含有 Sauton 培地(SM)：SM 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地(P³²+SM)：P³² 30 μ c/ml+SM 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地

(cont.)：Sauton 培地

表7 P³², INAH および P³²+INAH の
感性菌の発育に及ぼす影響

培地	(P ³²)	(P ³² +INAH)	(INAH)	(cont.)
乾燥重量	201 *	196	190	205

* 単位は mg 培養：5日

(P³²)：P³² 30 μ c/ml 含有 Sauton 培地(P³²+INAH)：P³² 30 μ c/ml+INAH 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地(INAH)：INAH 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地

(cont.)：Sauton 培地

表8 P³², INAH および P³²+INAH の感性菌の
INAH 感受性に及ぼす影響

培地	INAH (γ /ml)	100	50	10	5	1	0.1	0 (cont.)
	継代数							
(P ³²)	1			—	12	++	##	##
	2			—	7	++	##	##
	3			—	3	++	##	##
	4			—	9	++	##	##
	5			—	6	++	##	##
(P ³² +INAH)	1			—	22	++	##	##
	2	—	—	11	143	++	##	##
	3	—	—	41	++	##	##	##
	4	—	—	176	++	##	##	##
	5	—	2	++	##	##	##	##
(JNAH)	1				34	++	##	##
	2			6	192	++	##	##
	3	—	—	39	++	##	##	##
	4	—	—	206	++	##	##	##
	5	—	6	++	##	##	##	##
(cont.)	1			—	6	++	##	##
	2			—	8	++	##	##
	3			—	7	++	##	##
	4			—	13	++	##	##
	5			—	10	++	##	##

培地：小川培地 判定：5日 ++, ##：コロニー数算定不能

(P³²)：P³² 30 μ c/ml 含有 Sauton 培地

(JNAH)：INAH 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地

(P³²+INAH)：P³² 30 μ c/ml+INAH 0.05 γ /ml 含有 Sauton 培地

(cont.)：Sauton 培地

表9 使用せる3株のSMおよびINAH感受性

A. 感性菌

i) SM に対して

菌株 \ SM(γ /ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
感性菌	—	—	—	## (176) *	## (180)	## (188)

ii) INAH に対して

菌株 \ INAH(γ /ml)	10	5	1	0.1	0.05	0 (cont.)
感性菌	—	—	+ (22)	## (234)	## (225)	## (243)

B. SM 耐性菌

菌株 \ SM(γ /ml)	10,000	1,000	100	0 (cont.)
SM耐性菌	## (198)	## (190)	## (186)	## (204)

C. INAH 耐性菌

菌株 \ INAH(γ /ml)	500	100	10	1	0 (cont.)
INAH耐性菌	—	## (212)	## (216)	## (232)	## (211)

培地：小川培地 判定：5日 * 数字はコロニー数